

氏 名	柿本 健作
学 位 の 種 類	博士（創薬科学）
学 位 記 番 号	医薬保博甲第42号
学位授与の日付	平成28年3月22日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第4条第1項）
学位授与の題目	<b>Findings on human exposure of halogenated organic pollutants through food and atmosphere</b> (食品及び大気を介した有機ハロゲン汚染化学物質によるヒト曝露実態の解明)
論文審査委員	主査 鳥羽 陽 副査 早川 和一 副査 小谷 明 副査 佐々木 陽平 副査 松木 篤

# 学位論文要旨

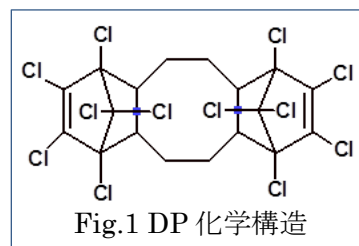
## abstract

In this study, I focus on the potential hazardous compounds (Dechlorane plus and chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons). Dechlorane plus (DP) is an industrially-manufactured chemical for flame retardant and, on the other hand, chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons (ClPAHs) are unintentionally-generated compounds. These compounds are still unrestricted and there is little information about their environmental pollution levels nor toxic effects at the present moment. So I think it is important to reveal the pollution and exposure level of these compounds. In this thesis, I determined these facts described below for the first time. (1) DP concentration in fish and revealed the correlation among halogenated flame retardants (DP, PBDE, and HBCD). (2) The dietary and inhalational DP exposure level in Japan. (3) The atmospheric DP level in East-Asian countries and DP particle size fraction distribution behavior. (4) The atmospheric ClPAH levels in East-Asian countries. (5) The atmospheric particle size distribution of ClPAH concentrations. (6) The oxidative reaction metabolites of Chloropyrene and revealed the kinetics of their production by relevant drug-metabolizing enzymes. In addition, I found that Chloropyrene metabolites retained AhR ligand activity.

有機ハロゲン化合物であるデクロラン・プラス（DP）及び塩素化多環芳香族炭化水素（ClPAHs）を対象化合物とし研究を行った。塩素系難燃剤である DP と非意図的生成物 ClPAHs は既知の環境汚染物質に類似した化学構造または性質を有することから、既存の環境汚染物質同様に環境及び生体に有害作用を有する恐れがあるが、DP 及び ClPAHs の環境や生体試料中残留レベルや有害作用に関する報告は限られているのが現状である。本研究ではそれらの新規環境汚染物質レベルを明らかにすることを目的とした。

### 【デクロラン・プラス】

DP (Fig. 1) は Mirex (デクロラン) の代替品として登場し 1960 年代から生産されている塩素系難燃剤である。トラッキングを起こしにくい性質を持っていることから主に電気ケーブルやワイヤーの被膜に用いられ、主にポリマー樹脂に混合して使用される。従来のハロゲン系難燃剤であるポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDE) やヘキサブロモシクロデカン (HBCD)



の規制が進む一方で、EU において DP が PBDE の 1 種である BDE-209 の代替物として提案される等、DP 需要は今後増加することが予想される。DP は化審法で高濃縮性の判断基準となる 3.5 を大きく超える 9.3 という Log Kow 値を有することから環境中、生物蓄積が懸念されるが、DP の生物濃縮性、肝臓への有害作用や代謝攪乱作用等の生体影響作用が最近明らかになってきた。DP 汚染状況を明らかにしていくことはヒトへのリスクを考える上で重要であるが、実際どれくらいの DP をヒトが日々曝露しているのか未だ不明である。そこで、日本における食品及び大気中の DP 汚染実態を明らかにし、ヒトへの曝露量を解明することを目的とした。まず、従来の POPs が特徴的に残留することで知られている魚類について DP の残留実態を調査した。

試料 15g に対しクリーンアップスパイクを加え、ヘキサン/ジエチルエーテルによる抽出を行った。抽

出液をゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)により精製した。GPC 移動相を濃縮し得られた溶液に対し 44% 硫酸シリカゲルで更なる精製を行ったものをガスクロマトグラフ-高分解能質量分析計 (GC/HRMS) にて分析した。その結果、日本で流通する魚中にデクロラン・プラス (DP) が残留していることが初めて明らかとなった。DP は今回分析した 20 種類の魚試料のうち 18 種から検出された。検出濃度は 0.2 未満から 14.2 pg/g wet weight であった。兵庫県で水揚げされたスズキで最も高く、千葉県のイワシ、兵庫県のアジそして富山県のサワラに比較的高い濃度の DP が残留していた。大型肉食魚であり河口や湾岸域に生息するスズキは従来の POPs 類でも高濃度曝露が報告されているが、DP においても最も高い濃度を示した。DP は cyclo-octadiene と hexachlorocyclo-pentadiene の Diels-alder 反応により合成され、*syn*-DP と *anti*-DP の異性体が存在する。魚試料中に残留する DP を異性体別にみると *anti*-DP 濃度が *syn*-DP に比べて高くなる傾向があった。 $f_{anti}$  値 ( $anti\text{-DP}/[syn\text{-DP} + anti\text{-DP}]$ ) の平均値は 0.62 で工業用 DP 製品中異性体比 (0.7-0.8) に比べ低い値であった。今回の調査により日本で流通する魚中に DP が残留していることが明らかとなった。

続いて食事からの DP 摂取量を明らかにするためにトータルダイエットスタディー試料を分析した。大阪府内のスーパーマーケットにて 2012 年に購入した 123 種の食品について、厚生労働省の国民栄養調査の食品別摂取量表に基づいて、それらを計量し、そのまま、または調理した後、13 群に大別して、混合

し均一化したものを試料とした (Table1)。

DP は 13 種類のうち 4 つの群 (Ⅲ、Ⅴ、Ⅹ、ⅩⅠ) から 1.5-3.3 pg/g wet wt の濃度で検出された。検出された食品群中 DP の  $f_{anti}$  値は  $0.62 \pm 0.09$  (mean  $\pm$  one standard deviation) で工業製品中 DP のそれよりも低く、特に魚介類群 (Ⅹ) で  $f_{anti}=0.49$  となった。*syn*-DP は *anti*-DP に比べ、

食物連鎖による蓄積を受けやすいことが報告されていることからそのことが食品特に魚介類群における低い  $f_{anti}$  値につながったと考えられた。

一方、吸入による DP 曝露量を明らかにするため、大阪府立公衆衛生研究所屋上にてハイボリウムエアーサンプラーを使用し、石英繊維フィルターに一週間毎に大気粉塵を捕集した。フィルターをジクロロメタンで超音波抽出し、抽出液を濃縮した後、シリカゲルおよび硫酸シリカゲルにて精製を行い、濃縮したものを分析試料とした。大気粉塵中 DP 濃度は 7.1-15.4 pg/m<sup>3</sup> (平均値 11 pg/m<sup>3</sup>) であった。 $f_{anti}$  値は  $0.74 \pm 0.05$  で工業原体中の値に近かった。大気輸送中の太陽光による UV 照射により

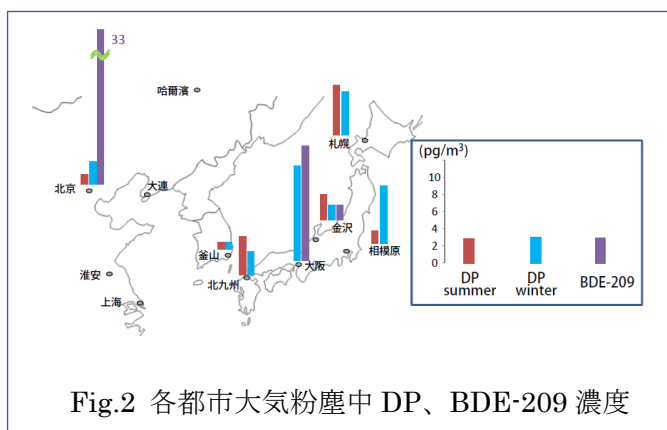


Fig.2 各都市大気粉塵中 DP、BDE-209 濃度

*anti*-DP が特異的に減少することが報告されていることから大阪で捕集した大気粉塵中 DP は長距離輸送を経たものではなく、日本国内を発生源としたものであることが考えられた。今回大気粉塵及び食品試料中から DP が検出された。大気粉塵試料において DP 濃度は臭素系難燃剤であるポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDE) のおよそ 4 分の 3、食事試料においておよそ 100 分の 1 であることが明らかとなり、大気中濃度では両者の差は小さかった一方で、食品試料では大きな差がみられた。大気や土壌等の環境汚染が食品汚染まで広がるまで時間的なギャップが生ずるが、DP の使用量が増加してきたのはここ 10 年ほどであることを考慮すると、従来からの汚染物質である PBDE に比べ DP の食品汚染は始まったばかりであると考えられた。検出値を基に DP 及び PBDE のヒトへの一日曝露量を算定した結果、呼吸率を 15.7 m<sup>3</sup>/day (US EPA, 2011) とした場合、大気からそれぞれ 170 pg/day 及び 240 pg/day、また、成人の場合食事からそれぞれ 580 pg/day 及び 62000 pg/day 曝露していることが明らかとなった。大阪で捕集した大気粉塵中に DP が検出されたことから、日本の各都市における大気中 DP 濃度を海外都市と比較調査を行った。日本 (札幌、相模原、金沢、北九州)、韓国 (釜山) 及び中国 (北京) にて冬季及び夏季にハイボリウムエアサンプラーを使用し捕集した大気粉塵を分析した。金沢、北京の試料については PBDE のうちストックホルム条約における POP s 未指定化合物である 10 臭素化合物 (BDE-209) も併せて分析を行った。冬夏平均総 DP 濃度 (*syn*、*anti* の合計) は札幌 (5 pg/m<sup>3</sup>) > 相模原 > 北九州 > 金沢 > 北京 > 釜山 (0.9 pg/m<sup>3</sup>) の順に高かった (Fig. 2)。今回得られた日本の 4 都市の DP 濃度に大阪の結果を併せたものを各都市

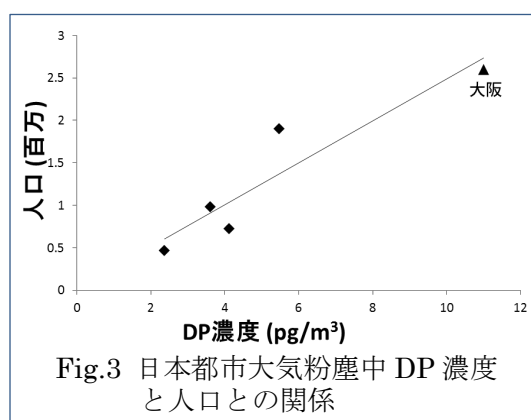


Fig.3 日本都市大気粉塵中 DP 濃度と人口との関係

の人口と比較したところ良好な相関がみられた (Fig. 3)。このことは、DP の発生要因がその地域の人々の生活に関係しており、家電等の家庭用品や電線等のケーブルなどを発生源としていることが考えられた。北京の DP 濃度 (1.98 pg/m<sup>3</sup>) を中国の他都市における報告例と比較すると DP 製造工場のある淮安市 (7737-26,734 pg/m<sup>3</sup>)、大連市 (3 pg/m<sup>3</sup>)、上海市 (2.3-5.5 pg/m<sup>3</sup>) よりも低く、哈爾濱市 (0.4 pg/m<sup>3</sup>) よりも高い値であった。このことから、中国における大気中 DP 濃度は DP 生産工場の存在する淮安市から遠い都市ほど DP 濃度が低くなることが示唆された。 $f_{anti}$  平均値は日本の 4 都市において 0.69 から 0.73 で、これらは工業原体の比率に近い。一方、釜山では 0.63 と日本の各都市に比べ少し低い値となった。*anti*-DP は大気輸送中に紫外線等の影響で減少することが報告されていることから、釜山大気中の DP の一部は長距離輸送されてきている可能性が示唆された。DP 濃度は北京に比べて金沢の方が少し高かった、一方で BDE-209 は北京 (33 pg/m<sup>3</sup>) の方が金沢に比べて約 20 倍高いことが分かった。このことは、中国では BDE-209 が依然として主要な難燃剤として使用されていることを示している。

今回分析したすべての試料から DP が検出された。また、日本の 4 都市で韓国や中国よりも高い濃度であることを明らかにした。このことは、DP 生産工場のない日本においても DP 含有製品等を発生源とする汚染が進んでいることを示していると考えられた。

### 【塩素化多環芳香族炭化水素】

塩素化多環芳香族炭化水素類 (ClPAHs) は多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の置換反応により非意図的に生成する汚染物質である。ClPAHs の中にはアリルヒドロカーボン受容体 (Ahr) への結合能が benzo[*a*]pyrene (BaP) とほぼ同等かそれ以上の物質が存在し、また TA100 株において強い変異原性を有す

るものも存在する等、曝露量の評価が急務となっているが、まだその詳細な生成機構、環境中挙動、生体影響は明らかになっていないのが現状である。C1PAHs 曝露量及び代謝挙動に関する報告は皆無であり、本研究で C1PAHs の日本における大気レベルを知ることで、C1PAHs 曝露実態を初めて明らかにできる。本研究ではハイボリウムエアサンプラーで捕集した各国都市における大気粒子状物質中の C1PAHs についてその存在量を明らかにするとともに、濃度の高かった C1PAH についてヒトにおける代謝挙動の解明を試みた。

大気粉塵試料は DP と同様の試料（札幌、相模原、金沢、北九州、釜山及び北京）を使用した。フィルターをジクロロメタンで抽出し、シリカゲルで精製したものを GC/HRMS で分析した。

分析した結果、対象とする 19 種の C1PAHs 中で C1-BaP および C1-Pyrene 濃度が最も高いことがわかった (Fig. 4)。また、総 C1PAH 濃度は北京の冬で最も高く (211 pg/m<sup>3</sup>)、日本の都市や釜山の同時期の大気のおよそ 20 倍であることが明らかとなった。AhR 活性化能を指標とする毒性等量 (TEQ) を基に算出すると、日本都市で最も高値を示した北九州冬季では 1 日あたり 864 fg の TCDD 相当の毒性を有する C1PAH に曝露されていることがわかった。一方で、総 PAH 濃度もまた北京の冬で最も高く (420000 pg/m<sup>3</sup>)、日本で最も高い北九州の冬の大気と比較しておよそ 90 倍であった。PAH に対する C1PAH の割合が、日本都市や釜山の方が北京に比べて高いことから、日本都市における C1PAH 濃度レベルは低いものの、北京に比べ C1PAH がより生成しやすい状況にあることが今回の調査で分かった。

また、大阪市内で PM<sub>0.1</sub> エアサンプラーを使用し、粒径別 (PM<sub>>10</sub>, PM<sub>10-2.5</sub>, PM<sub>2.5-1.0</sub>, PM<sub>1.0-0.5</sub>, PM<sub>0.5-0.1</sub> 及び PM<sub>0.1</sub>>) に捕集した大気粉塵を試料とし、C1-BaP および C1-Pyrene 濃度の粒径分布を調査した。その結果、これら C1PAH は PAH と同様の粒径分布傾向を有し、特に PM<sub>2.5</sub> 以下の画分に多く分布する、すなわち肺への到達率の高い画分で高濃度となる事が明らかになった (Fig. 5)。また、各粒径画分の抽出・精製液を使用し酵母レポータージーンアッセイ系を用いた Ahr 受容体結合能試験を行った結果、PM<sub>2.5</sub> 以下の画分において Ahr 結合能を有する物質が多く存在していることが判った。C1PAH、PAH の AhR 結合能と粒径別濃度分布を考慮すると、C1PAH、PAH は主に PM<sub>2.5-1.0</sub>, PM<sub>1.0-0.5</sub> 画分における AhR 活性化へ寄与していると考えられた。

C1PAH は PAH 同様、焼却炉や自動車排ガス等の燃焼由来や食品の

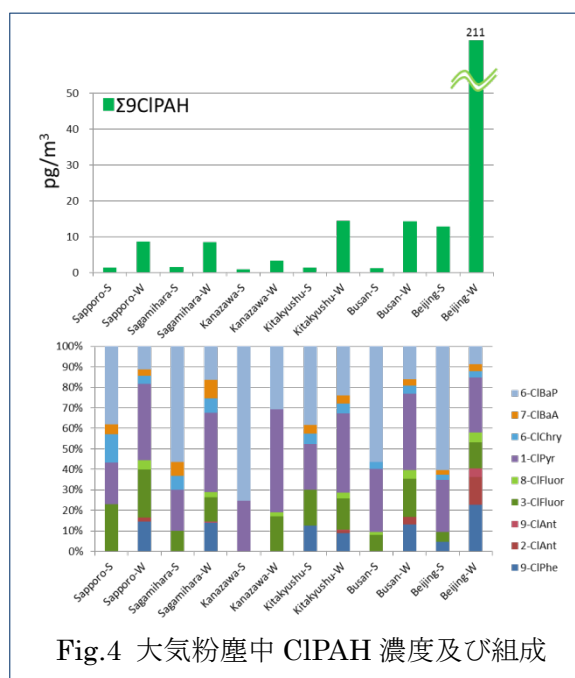


Fig.4 大気粉塵中 C1PAH 濃度及び組成

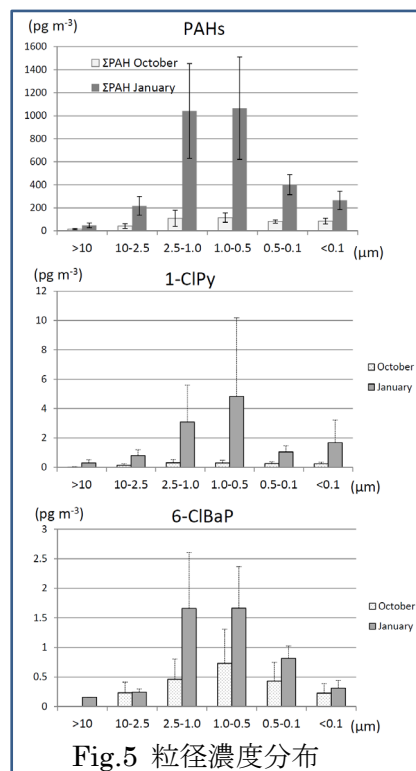


Fig.5 粒径濃度分布



加熱等により生成し、また大気中や干潟等で二次的に生成することも報告されている。そのように複雑な発生源を有する ClPAH の各曝露源を測定し曝露量を評価することは困難である。PAH の曝露評価方法として尿中の代謝物をバイオマーカーとする手法が知られている。その場合 PAH がヒト体内でどのような代謝経路を辿ることが重要となる。その手法を ClPAH に応用することは ClPAH 曝露評価方法を構築する上で足がかりとなるが、ClPAH のヒト体内における代謝挙動は全く明らかになっていない。そこで、最終的に ClPAH 曝露評価方法を確立することを目的とし、その代謝挙動をまず明らかにすることとした。大気中主要 ClPAH である、Cl-Pyrene についてヒトにおける代謝挙動を解明するために、AhR に依存し誘導を受ける第 I 相代謝酵素 (P4501A1、1A2、及び 1B1) を用いた *in vitro* 実験を行い代謝物の探索を行った。その結果、3 つの主要代謝物の存在を確認し、それらが 3Cl-pyren-1-ol、6Cl-pyren-1-ol、8Cl-pyren-1-ol であることを同定した (Fig. 6)。また Cl-Pyrene は CYP1A1、1A2、1B1 酵素の中で 1A1 で最も代謝生成されやすく、各種酵素によって 3 種の代謝化合物の生成割合に差が生じることがわかった。今回 Cl-Pyrene の主要代謝物を明らかにできたことで、今後尿中のこれら代謝物の定量的分析方法の確立及びバイオマーカーとしての有用性の評価を行うことが必要であると考えている。

また代謝物の AhR 結合能を調べたところ ClPyrene と同様に AhR 結合能を保持していることが判明した。このことは

Cl-Pyrene が AhR に結合し誘導した酵素により代謝を受けた後にもその代謝物により AhR が活性化を受け続ける可能性が示された。持続する AhR の活性化は突然変異原性、発がん性、免疫系の異常等ヒトへの有害作用を引き起こすことが指摘されていることから、今後、第 II 相反応を含めた代謝機構の更なる解明等が必要と考えられる。

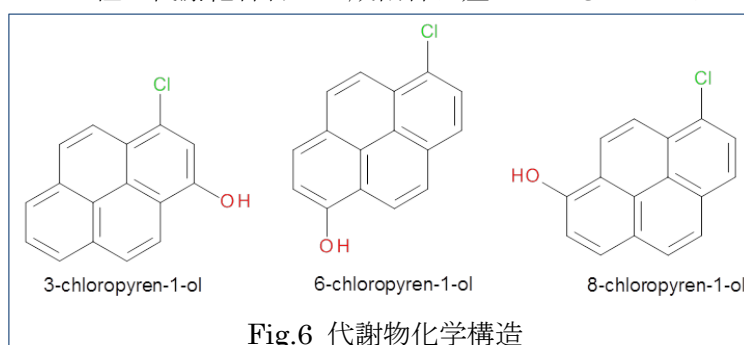


Fig.6 代謝物化学構造

# 審査結果の要旨

〔審査経過〕平成 28 年 1 月 8 日に、学位申請論文に対する各審査委員による諮問を実施した。次いで平成 28 年 2 月 9 日に、審査方針に従って口頭発表（最終試験）を行い、終了後に開催した論文審査委員会において協議の結果、以下のように判定した。

〔審査結果〕塩素系難燃剤であるデクロラン・プラス（DP）と非意図的生成物である塩素化多環芳香族炭化水素（ClPAHs）は環境及び生体に有害作用を及ぼす新規の環境汚染物質となる恐れがある。本研究では DP 及び ClPAHs の環境汚染レベルと曝露実態を明らかにすることを目的とした。ヒトの DP 曝露実態を明らかにするため、一般的な食品 123 種を 13 群に大別して分析し、4 群から DP を検出した。また、大阪で捕集した大気粉じん試料からも DP が検出され、DP の生産を行っていない日本においても DP 汚染が進んでいることが分かった。大気試料について ClPAHs を分析した結果、19 種の ClPAHs を定量し、PM2.5 に高濃度分布していることが分かった。また、ClPAHs のヒトにおける主要な代謝物を同定することに成功した。本研究は、ハロゲン系難燃剤 DP のヒト曝露レベル、日本における大気汚染実態、ClPAHs の代謝挙動を世界で初めて明らかにすることに成功した。以上の成果より、審査委員会は学位申請論文が博士（創薬科学）に値すると判定した。